

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601  
研究種目：基盤研究(A) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20H00525  
研究課題名(和文) 神経変性疾患におけるストレス依存的な凝集タンパク質の生成・放出機構

研究課題名(英文) Stress dependent production and release of aggregated proteins in neurodegenerative disorders

研究代表者  
岩坪 威 (Iwatsubo, Takeshi)  
東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：50223409  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患における細胞ストレスと病因タンパク質の蓄積、放出機構を検証した。アルツハイマー病には代謝ストレスによりERストレスの亢進、全身から脳に伝えられる病的シグナルによりアミロイド病理性が増悪することを示した。タウタンパク質がグリアリンパ系により脳外に放出され、アミロイドによるストレスがこの過程を抑制することを示した。パーキンソン病においてシヌクレイン蓄積物がLRRK2-Rab10シグナルにより放出とフィードバックを受けることを示した。FUSタンパク質のリン酸化等翻訳後修飾により不溶性が制御されることを示した。このように各種変性疾患において細胞ストレスが病態を増悪させることが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
アルツハイマー病、パーキンソン病等個別の神経変性疾患に固有の病因タンパク質形成、放出機構の解明を進めることにより、各疾患に特異的な病態が明らかになるとともに、各種の細胞ストレスが神経変性を助長するとの仮説の一端が実証され、今後の神経変性疾患の予防、治療法の開発の方向性に指針を与えることができた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of cellular stress on the aggregation and release of pathogenic proteins. In Alzheimer's brains, metabolic stress aggravated ER stress and systemic to brain transmission of noxious signals to enhance amyloid pathology. Tau proteins were shown to be cleared through the glymphatic system, which was enhanced by amyloid stress. Alpha-synuclein aggregates were released by LRRK2-Rab10 signal in a reciprocal manner. Phosphorylation of FUS protein attenuated its insolubility. These findings underscored the importance of various cellular stresses in the aggregation and release of causative proteins.

研究分野：神経病理学

キーワード：細胞ストレス 神経変性 アルツハイマー病 パーキンソン病 タウ蓄積症

## 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、緩徐・進行性に神経細胞の変性・脱落が引き起こされる疾患群であり、主な疾患として大脳皮質の神経細胞が冒され認知症を呈するアルツハイマー病 (Alzheimer's Disease; AD)、前頭葉や側頭葉の変性により認知症を呈する前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration; FTL D)、中脳黒質のドパミン神経細胞ほかの障害により振戦や筋固縮を呈するパーキンソン病 (Parkinson's Disease; PD)、運動ニューロンの脱落により骨格筋の萎縮を生じる筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) などがある。しかしその本質的メカニズムは未だ不明であり、高齢化社会を迎えて患者数は急激に増加しつつあることから、その克服は喫緊の課題であった。

神経変性疾患の脳には、各疾患を特徴づける病理構造物が出現する。AD では細胞外の老人斑と、神経細胞内に神経原線維変化、FTLD では Pick 球やユビキチン陽性封入体、PD では変性ニューロンの細胞質にレビー小体、ALS ではユビキチン陽性封入体等が出現する。近年進んだ変性疾患脳の生化学的・病理学的解析により、AD におけるアミロイドβ (Aβ)、AD や FTL D におけるタウ、PD における シヌクレイン、FTLD や ALS における TDP-43 や FUS など、疾患ごとに特徴的な病因タンパク質の存在が明らかになった。さらに、AD、PD 等神経変性疾患の一部には家族例が存在し、病因タンパク質や産生酵素をコードする遺伝子に病因変異が同定されている。これらの知見から、神経変性疾患において病因タンパク質は疾患脳に蓄積する「結果」であるのみならず、疾患発症に関与する「病因」的役割を担っている可能性が強く示唆されてきた。

従来、家族性遺伝子変異を持った病因タンパク質に焦点をあてて多くの研究が進められてきた。例えば、家族性 AD の病因遺伝子である Aβ precursor protein (APP) の点突然変異は、Aβ の総量や凝集性を高めること、FTLD 変異型のタウを過剰発現する tg マウス脳では、リン酸化タウの蓄積と神経細胞死が生じることが示された。これらの知見から、何らかの異常構造を獲得した病因タンパク質が、凝集する過程において神経変性が生じ、凝集した異常タンパク質がさらに神経細胞間を伝播することにより病変の拡大に至るという共通原理が想定されるに至った。しかしこれまで、神経変性疾患の大多数を占める孤発例において病因タンパク質がいかなる機序で異常構造を獲得するのか、さらに異常構造を獲得した病因タンパク質がどのような機序で神経細胞間を伝播するのかは明らかになっておらず、真の疾患発症機序の解明には至っていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、家族性神経変性疾患の病因遺伝子の中でも病因タンパク質自身、あるいはその産生に関わる遺伝子群にとどまらず、異常構造の獲得に関与する可能性がある遺伝子群に注目し、病因タンパク質が、神経細胞内で発生する何らかの変性作用(「細胞ストレス」と定義)に曝露されることによって異常構造を獲得し、神経細胞の変性・死を惹起すると同時に、放出された異常タンパク質が神経細胞間を伝播し、病変が拡大するものと着想した。最近、TDP-43 や FUS、タウなどが、いずれもアミノ酸配列の複雑性に乏しい intrinsically disordered/low-complexity (LC) 領域を介して液-液相分離現象 (liquid-liquid phase separation, LLPS) を生じることがわかり、この「相分離シグナル」が異常構造獲得の誘因として注目されている。そこで本研究においては、神経細胞内に蓄積し、封入体を形成する代表的な病因タンパク質であるタウ、αシヌクレイン、TDP-43、FUS に焦点をあて、それぞれの病因タンパク質が「細胞ストレス」によって異常構造を獲得し、細胞間を伝播する機序の解明を進める。さらに、病因タンパク質が変性過程を経て神経細胞外に放出される普遍的機構を解明し、神経変性疾患共通の発症原理の解明を通じて、新たな治療標的の同定に繋げることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、神経変性疾患の代表的な病因タンパク質であるタウ、αシヌクレイン、TDP-43、FUS が「細胞ストレス」により異常構造を獲得し、神経変性を惹起すると共に神経細胞間を伝播する機序の解明を試みた。

(1) タウが細胞ストレスによって変性し、伝播する機序の解明

(1-1) ストレス応答が誘発する凝集核タウ分子種の同定

in vivo 微小透析膜法を用いて回収した野生型及びタウ tg マウス脳の脳間質液を解析し、神経細胞間伝播が生じる時系列とタウ分子種を網羅的に解析する。さらに、タウバイオセンサー細胞を用いて各タウ分子種の seed 能を評価し、タウ病理の進展に関わる凝集核タウ分子種の同定と、in vivo seeding 実験による伝播への関与の実証を行う。さらに、組換えタウ凝集核 (pre-formed fibril: pff) を添加して細胞内に凝集体形成を誘導するタウ細胞伝播モデルにおいても、培養上清中に放出された凝集核タウ分子種を同様に分離・同定する。

(1-2) 細胞ストレス応答が惹起するタウ放出機構の解明

Aβ蓄積を生じる APP tg マウスとタウ tg マウスを交配すると、タウ病理が亢進し、APP tg マウス脳に凝集核タウを接種する in vivo seeding 実験により Aβ蓄積の周囲にタウ病理が出現すると

報告されている。これらの知見は、細胞外の凝集した A $\beta$ 分子種が「細胞ストレス」を生じて神経細胞内のタウの変性を引き起こし、伝播を促進する可能性を想起させる。そこで APP tg マウス脳におけるタウの蓄積、排出機構を解析し、A $\beta$ によるタウ変性過程の細胞内機序を明らかにする。

(2)  $\alpha$ シヌクレインがリソソームストレスによって変性し、伝播する機序の解明

(2-1)  $\alpha$ シヌクレイン分子種のリソソームストレス依存的な細胞外放出機構の解析

Lysosome exocytosis を介した $\alpha$ シヌクレインの細胞外放出・伝播を測定する実験系を培養細胞およびマウス個体で確立し、放出される $\alpha$ シヌクレインの分子種を明らかにするとともに、LRRK2 が果たす役割について検討を加える。

まずマウス培養神経細胞や $\alpha$ シヌクレイン発現 SH-SY5Y 細胞に組換え $\alpha$ シヌクレイン人工線維 (pf) を添加して細胞内凝集体形成を誘導後、chloroquine などのリソソームストレス誘導剤を投与し、 $\alpha$ シヌクレインの細胞外放出へ与える影響を検討する。

(2-2) LRRK2 によるリソソームストレス制御が $\alpha$ シヌクレイン放出に与える効果の検討

上記 $\alpha$ シヌクレイン放出・伝播測定系を用いて、LRRK2 によるリソソームストレス制御が $\alpha$ シヌクレインの放出・伝播に与える影響を解析する。マウス培養細胞や LRRK2 発現細胞を使用し、LRRK2 がリソソームストレスの制御を介して seeding 活性を有する $\alpha$ シヌクレインの放出に関するかを検討する。

(3) FUS が RNA ストレスによって変性し、伝播する機序の解明

(3-1) FUS が RNA ストレスによって自己重合し、異常構造を獲得する機序の解明

TDP-43、FUS は類似の機能領域を持ち、核内に局在する RNA 結合タンパク質である。しかし、ALS あるいは FTLD 患者神経細胞では細胞質封入体を形成することが知られている。これまでに arsenite や熱ショックなど RNA processing に障害を与える「RNA ストレス」下で、TDP-43、FUS は LLPS を形成して細胞質中の stress granule に局在することが知られ、申請者らは LLPS 形成に必須な FUS の LC 領域を介した自己重合が神経毒性発揮に必須であることを見出した。そこで「RNA ストレス」が相分離シグナルにより TDP-43 や FUS の細胞質移行・自己重合を促して LLPS 形成することが変性のトリガーとなる可能性を着想し、FUS の細胞質局在と自己重合の検討に BiLC/BiFC 法を利用し、RNA ストレス下の細胞内で TDP-43、FUS の挙動を細胞染色、生化学的に解析する。

(3-2) 異常構造を獲得した TDP-43、FUS が神経細胞間を伝播する機序の解明

LC 領域や自己重合の界面領域に変異を導入して自己重合能を喪失させた FUS を発現する AAV 発現系を作成し、RNA ストレスによって自己重合した TDP-43 あるいは FUS が神経細胞間を伝播するかを検証する。さらに BiLC を利用して樹立した TDP-43 あるいは FUS 伝播センサー細胞を用い、RNA ストレス下で TDP-43、FUS が lysosome exocytosis を含む、どのような細胞生物学的機序によって細胞外腔に放出されるかを薬理的、遺伝学的手法により明らかにする。さらに FUS の翻訳後修飾が可溶性に与える影響について解析する。

(4) 代謝ストレス、インスリンシグナル伝達経路がアミロイド 病理に及ぼす影響の解明

アルツハイマー病の重要なリスク因子である糖尿病等の代謝ストレス、ならびに密接に関係するインスリンシグナル経路がアミロイド 病理の形成に与える効果について、細胞内ストレス、インスリン受容体基質 (IRS1,2) との関連を踏まえて in vivo での検証を行う。

#### 4. 研究成果

(1) タウが細胞ストレスによって変性し、伝播する機序の解明：

In vivo 微小透析膜法を用いてマウス脳から間質液を回収し、タウ蓄積依存的に出現する数百キロダルトン以上のタウ分子種がバイオセンサー細胞に対して seed 能を示す凝集核タウ分子種であることを示した。神経細胞から脳間質液に放出されたタウが、glymphatic system (グリリンパ系) の働きにより aquaporin-4 (AQP4) 依存的に、脳脊髄液 (CSF) に向けて除去されていることを見出し、さらに CSF から脳実質へのタウの移行に対する AQP4 の影響について解析した。AQP4 欠損マウスにおいては CSF から脳実質へのタウ再流入も野生型マウスと比して抑制されていることを見出し、AQP4 がタウの脳間質液-脳脊髄液間のタウ移行に双方向性に関与することが明らかになった。さらに in vivo の脳において脳間質液中に存在するタウタンパク質がグリリンパ系により排出されるメカニズムを精査し、アミロイド  $\beta$  沈着による細胞外ストレスがグリリンパ系による排出を抑制することが、アルツハイマー脳におけるタウ蓄積の一因である可能性を示唆した。

(2)  $\alpha$ シヌクレインがリソソームストレスによって変性し、伝播する機序の解明： $\alpha$ シヌクレイン凝集体を内在化させたミクログリアやニューロンに対して、リソソーム過積載をもたらすクロロキンを投与すると、ミクログリアから  $\alpha$ シヌクレインが速やかに分泌されることを見出した。この  $\alpha$ シヌクレインは生化学的に不溶性であり、かつシード能を有することを確認した。ノックダウン実験から、この分泌は LRRK2 および基質 Rab10 に依存することを見出した。 $\alpha$ シヌクレイン凝集体を細胞に投与すると、LRRK2 が活性化してその特異的基質である Rab10 のリン酸化が亢進することを、神経系・非神経系を含む複数の細胞種において明らかにした。この時、LRRK2 と Rab のリソソーム膜上への局在化が生じていることを、proximity ligation assay 法による検討により実証した。リソソームストレス負荷時のミクログリアからの  $\alpha$ シヌクレイン分泌に関わる遺伝子・化合物を探索し、候補因子としてスフィンゴミエリナーゼ阻害薬 GW4869 などを

同定した。 $\alpha$ シヌクレイン凝集体がミクログリア等貪食細胞に取り込まれた後、エクソソームの外面に結合した形で放出され、伝播に寄与することを明らかにした。リソソームストレス負荷時の内容物放出と LRRK2-Rab10 経路活性化に関与する因子のスクリーニングにより、LRRK2 以外のキナーゼ群ならびにその阻害因子を同定した。

(3) TDP-43、FUS が変性し、伝播する機序の解明： FUS の細胞質局在と自己重合の検討に bimolecular luminescence/fluorescence complementation 法を利用して培養細胞に発現することにより、特定アルギニン残基の脱メチル化が FUS の重合を促進する可能性を見出した。また arsenite によるストレス顆粒形成と TDP-43 局在の生じる条件を検証した。FUS が細胞核に局在せず細胞質に局在し、凝集物を形成する過程において、アルギニン残基の脱メチル化が重要であることを見出した。培養細胞にストレス顆粒を形成させ、TDP-43 を局在させることに成功した。代謝ストレスを負荷した AD モデルマウスに化学シャペロンである TUDCA を投与することによりアミロイド  $\beta$  の蓄積を低減可能であることを示し、またこの過程に Sirt1 が関与している可能性を示唆した。FUS タンパク質の不溶化・蓄積を、カゼインキナーゼ 1 による FUS のリン酸化が抑制し、可溶性画分中に存在する FUS の量を増大させることを実証した。

(4) 代謝ストレス・インスリンシグナルと変性タンパク質凝集蓄積に関する検討： IRS-1 欠損マウス脳においては、IRS-2 欠損マウスにおいて観察されるアミロイド  $\beta$  蓄積の顕著な抑制が生じないこと、また脳内インスリンシグナルの主要成分は IRS-2 経路であることを実証した。代謝ストレスを負荷したアルツハイマー病モデルマウスに、脳以外の全身組織において NAD 分解酵素 CD38 を抑制する阻害薬を投与することにより、全身組織のみならず脳においても NAD レベルが低下し、アミロイド  $\beta$  蓄積も低下傾向を示すことから、全身組織における代謝ストレスが、間接的に何らかのシグナルを脳に送り、アルツハイマー病変化を助長する可能性を示した。

以上のごとく、3 年次に及ぶアルツハイマー病、パーキンソン病、タウ蓄積症、運動ニューロン疾患等に関する多面的な解析により、主要な神経変性疾患において、それぞれ固有の細胞ストレス因子が、神経変性を促進すること、また ER-リソソームストレス等の共通要因がそれを助長することが判明し、今後の予防・治療標的の同定に大きな手掛かりを与えることが可能となった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ochiai T, Nagayama T, Matsui K, Amano K, Sano T, Wakabayashi T, Iwatsubo T	4. 巻 4
2. 論文標題 Tauroursodeoxycholic acid attenuates diet-induced and age-related peripheral endoplasmic reticulum stress and cerebral amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Prev Alzheimers Dis	6. 最初と最後の頁 483-494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14283/jpad.2021.33	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ochiai T, Sano T, Kubota N, Kadowaki T, Wakabayashi T, Iwatsubo T	4. 巻 159
2. 論文標題 Differential involvement of insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2 in brain insulin signaling is associated with the effects of their deficiency on amyloid pathology in Alzheimer's disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2021.105510	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishida K, Yamada K, Nishiyama R, Hashimoto T, Nishida I, Abe Y, Yasui M, Iwatsubo T	4. 巻 219
2. 論文標題 Glymphatic system clears extracellular tau and protect from tau aggregation and neurodegeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20211275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20211275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuwahara T, Funakawa K, Komori T, Sakurai M, Yoshii G, Eguchi T, Iwatsubo T	4. 巻 145
2. 論文標題 Roles of lysosomotropic agents on LRRK2 activation and Rab10 phosphorylation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2020.105081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto T, Fujii D, Naka Y, Kashiwagi-Hakozaki M, Matsuo Y, Matsuura Y, Wakabayashi T, Iwatsubo T	4. 巻 8
2. 論文標題 Collagenous Alzheimer amyloid plaque component impacts on the compaction of amyloid- plaques.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01075-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kishino Y, Matsukawa K, Matsumoto T, Wakabayashi T, Nonaka T, Kametani F, Hasegawa M, Hashimoto T, Iwatsubo T	4. 巻 298
2. 論文標題 Casein kinase 1delta/epsilon phosphorylates fused in sarcoma (FUS) and ameliorates FUS-mediated neurodegeneration.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tomoki Kuwahara
2. 発表標題 Regulation of stressed lysosomes by LRRK2 in macrophage lineage cells
3. 学会等名 International Research Conference on Neurodegenerative Diseases (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原知樹
2. 発表標題 パーキンソン病における新規リソソームストレス応答機構
3. 学会等名 第40回 日本認知症学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田 薫、石田 和久、橋本 唯史、阿部 陽一郎、安井 正人、岩坪 威
2. 発表標題 Aquaporin4 がタウ蓄積と神経変性に果たす役割
3. 学会等名 第40回 日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoki Kuwahara, Tadayuki Komori, Kai Funakawa, Maria Sakurai, Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題 Analysis of Rab29 phosphorylation under lysosomal overload stress
3. 学会等名 AD/PD 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maria Sakurai, Tomoki Kuwahara, Tomoya Eguchi, Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題 Involvement of LRRK2 in the lysosomal and exosomal release
3. 学会等名 AD/PD 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamada K, Ishida K, Hashimoto T, Abe Y, Yasui M, Iwatsubo T
2. 発表標題 Aquaporin-4 deficiency exacerbates tau accumulation and neurodegeneration in a mouse model of tauopathies.
3. 学会等名 第 43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山田 薫 (Yamada Kaoru)  (00735152)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教  (12601)	
研究分担者	桑原 知樹 (Kuwahara Tomoki)  (10533903)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師  (12601)	
研究分担者	若林 朋子 (Wakabayashi Tomoko)  (20530330)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授  (12601)	
研究分担者	橋本 唯史 (Hashimoto Tadafumi)  (30334337)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授  (12601)	削除：2021年12月9日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------